



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0953—2020
代替 YY/T 0953—2015

医用羧甲基壳聚糖

Medical carboxymethyl chitosan

2020-09-27 发布

2021-09-01 实施

国家药品监督管理局 发布



目 次

前言 I

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 动物源性材料要求 2

5 技术要求 2

6 试验方法 4

7 标志 6

8 包装、运输和贮存 6

附录 A（资料性附录） 羧甲基壳聚糖参考红外谱图 7

附录 B（规范性附录） 羧甲基壳聚糖脱乙酰度和取代度测定 8

附录 C（规范性附录） 等电点的测定 10

附录 D（规范性附录） 重均分子质量及分子质量分布系数测定 11

附录 E（规范性附录） 羧甲基壳聚糖含量测定 12

附录 F（规范性附录） 蛋白质含量测定 13

附录 G（规范性附录） 乙醇残留量测定（气相色谱法） 15

附录 H（规范性附录） 二甘醇酸残留量测定 16

附录 I（资料性附录） 羧甲基壳聚糖降解试验 18

参考文献 19

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 YY/T 0953—2015《医用羧甲基壳聚糖》，与 YY/T 0953—2015 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 删除了范围中的检验规则(见第 1 章,2015 年版的第 1 章)；
- 修改了规范性引用文件以及《中华人民共和国药典》的版本年代号(见第 2 章,2015 年版的第 2 章)；
- 修改了羧甲基壳素和羧甲基壳聚糖的定义(见 3.3 和 3.4,2015 年版的 3.3 和 3.4)；
- 修改了外观的要求及试验方法(见 5.1 和 6.1,2015 年版的 5.1 和 6.1)；
- 修改了傅里叶变换红外光谱的部分吸收峰(见 5.2,2015 年版的 5.2)；
- 修改了取代度(羧化度)的试验方法(见附录 B,2015 年版的附录 C)；
- 增加了脱乙酰度的要求及试验方法(见 5.4,6.4 及附录 B)；
- 修改了等电点的要求及试验方法(见 5.5、附录 C,2015 年版的 5.4、附录 H)；
- 修改了干燥失重的要求(见 5.6,2015 年版的 5.5)；
- 修改了 pH 值的要求和试验方法(见 5.7,6.7,2015 年版的 5.6,6.6)；
- 修改了蛋白质含量的要求(见 5.12,2015 年版的 5.11)；
- 修改了炽灼残渣的要求及试验方法(见 5.14 和 6.14,2015 年版的 5.13 和 6.13)；
- 修改了不溶物的要求及试验方法(见 5.15 和 6.15,2015 年版的 5.14 和 6.14)；
- 修改了乙醇残留量的试验方法(见附录 G,2015 年版的附录 F)；
- 修改了微生物限度的要求(见 5.17.2,2015 年版的 5.16.2)；
- 修改了细菌内毒素检查的限量要求(见 5.18,2015 年版的 5.17)；
- 删除了生物学评价的具体要求及试验方法(见 5.19、6.19,2015 年版的 5.18 及 6.18)；
- 删除了检验规则(见 2015 年版的第 7 章)；
- 将“建议采用 YY/T 0466.1 中所给出的图形符号”由注移至正文(见 7.2,2015 年版的 8.1.2)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会(SAC/TC 110/SC 3)归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院、华南理工大学材料科学与工程学院、上海其胜生物制剂有限公司、石家庄亿生堂医用品有限公司、烟台万利医用品有限公司、青岛博益特生物材料股份有限公司、赛克赛斯生物科技股份有限公司、北京百利康生化有限公司、杭州协合医疗用品有限公司、四川省食品药品检验检测院、福建吉特瑞生物科技有限公司。

本标准主要起草人：付步芳、杜昶、蒋丽霞、李素哲、张荷新、姜惠萍、高伟伟、施波、施佳丽、刘兴兰、张其清。

本标准的历次版本发布情况为：

- YY/T 0953—2015。

医用羧甲基壳聚糖

1 范围

本标准规定了医用羧甲基壳聚糖原料的要求、试验方法、包装、运输和贮存等。

本标准适用于以壳聚糖或甲壳素为原料,经脱乙酰化、羧化、纯化而成的用于制造组织工程医疗器械产品的医用羧甲基壳聚糖。

注:羧甲基壳聚糖作为其他医疗器械产品的原料使用时可以参考该标准。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 14233.1 医用输液、输血、注射器具检验方法 第1部分:化学分析方法

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.17 医疗器械生物学评价 第17部分:可沥滤物允许限量的建立

YY/T 0313 医用高分子产品 包装和制造商提供信息的要求

YY/T 0466.1 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分:通用要求

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第1部分:风险管理应用

YY/T 0771.2 动物源医疗器械 第2部分:来源、收集与处置的控制

YY/T 0771.3 动物源医疗器械 第3部分:病毒和传播性海绵状脑病(TSE)因子去除与灭活的确认

中华人民共和国药典(2015年版 四部)

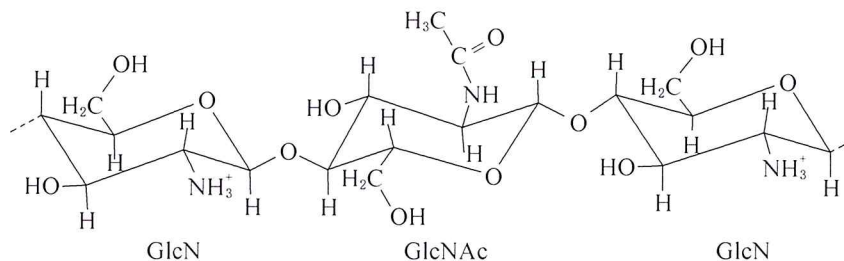
3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

壳聚糖 chitosan

由2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(GlcN)和2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(GlcNAc)通过 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 连接而成的线性聚多糖。其结构式为:



3.2

甲壳素 chitin

几丁质

甲壳质

化学名称: β -(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖, 为自然界的一种半透明而坚硬的材料, 是真菌的细胞壁和节肢动物的外骨骼里的主要组成部分。

3.3

羧甲基甲壳素 carboxymethylchitin

甲壳素的羟基上的氢被羧甲基取代后的产物。

3.4

羧甲基壳聚糖 carboxymethylchitosan

羧甲基甲壳素脱乙酰化后或壳聚糖的羟基/氨基上的氢被羧甲基取代后的产物。

3.5

残留物 residues

在原料中存在或材料加工过程中引入(或产生)的可能对人体产生一定副作用的需要去除而可能在最终产品中仍然会残留的某种(些)物质。

3.6

降解 degradation

环境条件下引起的材料的化学键断裂, 导致机械性能和/或化学完整性降低。

3.7

体外降解 degradation in vitro

贮存于生理液中或模拟环境中所引起的降解。

4 动物源性材料要求

动物源性初始原料, 应按 YY/T 0771.1、YY/T 0771.2 和 YY/T 0771.3 的要求进行管理和控制。

5 技术要求

5.1 外观

羧甲基壳聚糖应为白色或淡黄色固体, 无肉眼可见异物。

5.2 鉴别

羧甲基壳聚糖的傅里叶变换红外光谱(FT-IR), 在 $3\,250\text{ cm}^{-1}$ ~ $3\,450\text{ cm}^{-1}$ (宽峰)、 $2\,910\text{ cm}^{-1}$ ~ $2\,950\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,600\text{ cm}^{-1}$ (或 $1\,654\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,550\text{ cm}^{-1}$)、 $1\,380\text{ cm}^{-1}$ (或 $1\,410\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,323\text{ cm}^{-1}$) 有羧甲基壳聚糖特征吸收峰。除了 $3\,250\text{ cm}^{-1}$ ~ $3\,450\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,910\text{ cm}^{-1}$ ~ $2\,950\text{ cm}^{-1}$ 波数处的吸收峰外, 其他特征吸收峰实测值的波数误差应小于规定值的 0.5%。

注: 羧甲基壳聚糖参考红外图谱参见附录 A。

5.3 取代度(羧化度)

羧甲基壳聚糖的取代度应大于 80%。

5.4 脱乙酰度

羧甲基壳聚糖的脱乙酰度应符合标示值。

5.5 等电点

羧甲基壳聚糖的等电点应符合标示值。

5.6 干燥失重

羧甲基壳聚糖的干燥失重应不大于 15% (质量分数)。

5.7 pH 值

羧甲基壳聚糖检验液的 pH 值应在 6.0~8.0 之间。

羧甲基壳聚糖如果主要以钠盐形式存在,其检验液的 pH 值应符合标示值。

5.8 透光率

羧甲基壳聚糖检验液在波长 660 nm 处透光率应不小于 98.0%。

5.9 重均分子质量及分子质量分布

应确定羧甲基壳聚糖的重均分子质量和允差范围,分子质量分布系数应在 1.0~3.0 范围内。

5.10 紫外吸光度

羧甲基壳聚糖检验液在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度均不大于 0.1。

5.11 羧甲基壳聚糖含量

羧甲基壳聚糖含量应不小于 85% (质量分数)。

5.12 蛋白质含量

羧甲基壳聚糖蛋白质含量应不大于 0.2% (质量分数)。

5.13 重金属和微量元素

5.13.1 羧甲基壳聚糖重金属总量(以 Pb^{2+} 计,铁元素除外)应不大于 10 $\mu g/g$ 。

5.13.2 总砷含量不大于 4 $\mu g/g$,汞含量不大于 4 $\mu g/g$,铁含量不大于 50 $\mu g/g$ 。

5.14 炽灼残渣

羧甲基壳聚糖炽灼残渣应符合标示值。

5.15 不溶物

羧甲基壳聚糖中不溶物应不大于 0.5% (质量分数,以干燥品计)。

5.16 残留物

5.16.1 乙醇残留量

羧甲基壳聚糖中乙醇残留量应不大于 0.5% (质量分数)。

5.16.2 二甘醇酸残留量

羧甲基壳聚糖中二甘醇酸残留量应不大于 0.1% (质量分数)。

5.16.3 其他残留物

若产品含有《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0861 残留溶剂测定法附表 1 中一、二类溶剂,以及经确证含有的其他有害残留物,应按 GB/T 16886.17 要求给出许可限量。

5.17 无菌或微生物限度

5.17.1 若原料标示为“无菌”,应通过无菌检查,或者通过生产者的文件验证是否符合无菌规定。

5.17.2 若原料为非无菌,需氧菌总数应小于 100 CFU/g,霉菌和酵母菌菌落数应小于 10 CFU/g,不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌。

5.18 细菌内毒素

若原料标示为“无菌”,细菌内毒素应小于 0.05 EU/mg。

5.19 生物学评价

应按照 GB/T 16886.1 的要求进行生物学评价。

6 试验方法

6.1 外观

目视观察,应符合 5.1 规定。

6.2 鉴别

按照《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0402 红外分光光度法测定,应符合 5.2 规定要求。

注:羧甲基壳聚糖,采用 KBr 压片法制样。

6.3 取代度(羧化度)

按照附录 B 规定的方法测定,应符合 5.3 规定。

6.4 脱乙酰度

按照附录 B 规定的方法测定,应符合 5.4 规定。

6.5 等电点

按照附录 C 规定的方法测定,应符合 5.5 规定。

6.6 干燥失重

按照《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0831 干燥失重测定法测定,应符合 5.6 的规定。

6.7 pH 值

羧甲基壳聚糖以新沸并放冷至室温的纯化水配制成 10 mg/mL 的检验液,按照《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0631 pH 值测定法测定,应符合 5.7 规定要求。

6.8 透光率

取羧甲基壳聚糖用 0.9%氯化钠溶液配制成 1 mg/mL 的检验液,以同批次的 0.9%氯化钠溶液为

空白对照,按《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0401 紫外-可见分光光度法测定,应符合 5.8 规定要求。

6.9 重均分子质量及分子质量分布

按照附录 D 规定的方法测定,应符合 5.9 规定。

6.10 紫外吸光度

用 0.9% 氯化钠溶液配制成含羧甲基壳聚糖 1 mg/mL 的检验液。按照《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0401 紫外-可见分光光度法测定,测定的吸收值应符合 5.10 规定。

6.11 羧甲基壳聚糖含量

按照附录 E 的方法测定,应符合 5.11 规定。

6.12 蛋白质含量

按附录 F 的方法测定,应符合 5.12 规定。

6.13 重金属和微量元素

6.13.1 重金属总量(以 Pb^{2+} 计)按《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0821 重金属检查法第二法测定,若按该法操作溶液有颜色,可按《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0821 第一法中“若供试品溶液带颜色”项下进行,应符合 5.13.1 规定。

6.13.2 微量铁元素按《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0406 原子吸收分光光度法或 0412 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定;总砷、汞按 GB/T 14233.1 原子荧光光谱法或按《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0412 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定,应符合 5.13.2 规定。

6.14 炽灼残渣

取羧甲基壳聚糖 0.5 g~1.0 g,按《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0841 炽灼残渣检查法进行,应符合 5.14 规定。

6.15 不溶物

称取羧甲基壳聚糖 1.0 g(按干燥品计算),溶解于 100 mL 纯化水中,搅拌至完全溶解,将溶液转移至 1 L 烧杯中,加水 900 mL,加热至微沸保持 0.5 h,加热过程中盖住烧杯口。用恒重的砂芯漏斗(3 号)过滤,用水洗涤残留物,并在 100 °C~105 °C 电热鼓风干燥箱中干燥至恒重。应符合 5.15 的规定。

6.16 残留物测定

6.16.1 乙醇残留量测定

按照附录 G 的方法测定,应符合 5.16.1 规定要求。

6.16.2 二甘醇酸残留量测定

按照附录 H 方法测定,应符合 5.16.2 规定要求。

6.16.3 其他残留物

若产品含有《中华人民共和国药典(2015年版 四部)》0861 残留溶剂测定法附表 1 中一、二类溶剂,

以及经确证含有的其他有害残留物,应按 GB/T 16886.17 要求给出许可限量,并给出相应的检验方法。

6.17 无菌或微生物限度

6.17.1 无菌

按《中华人民共和国药典(2015 年版 四部)》1101 无菌检查法测定,应符合 5.17.1 的规定。

6.17.2 微生物限度

按《中华人民共和国药典(2015 年版 四部)》1105 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法和 1106 非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法进行,应符合 5.17.2 的规定。

6.18 细菌内毒素

按《中华人民共和国药典(2015 年版 四部)》1143 细菌内毒素检查法检验,应符合 5.18 规定要求。

6.19 生物学评价

应按照 GB/T 16886.1 的要求进行生物学评价。

注:资料性附录 I 给出了羧甲基壳聚糖降解试验的一种方法。

7 标志

7.1 大包装上应至少有下列标志:

- a) 产品名称;
- b) 性状;
- c) 生产企业名称和地址;
- d) 规格;
- e) 生产批号或日期;
- f) 失效日期;
- g) 贮存条件。

7.2 小包装上应至少有下列标志:

- a) 产品名称;
- b) 生产企业名称和地址;
- c) 产品技术要求编号和名称;
- d) 规格;
- e) 生产批号或日期;
- f) 失效日期;
- g) 无菌或微生物限度;
- h) 贮存条件。

建议采用 YY/T 0466.1 中所给出的图形符号。

7.3 储运标志

应符合 GB/T 191 中的规定。

8 包装、运输和贮存

产品的包装、运输和贮存应符合 YY/T 0313 的规定。

附 录 A
(资料性附录)
羧甲基壳聚糖参考红外谱图

羧甲基壳聚糖参考红外图谱见图 A.1。

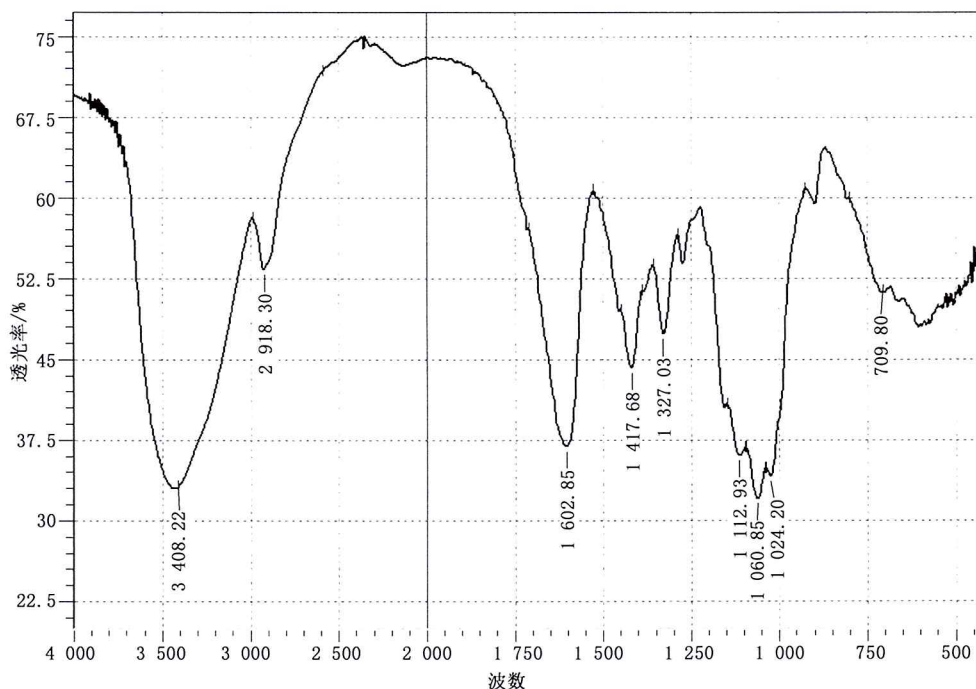


图 A.1 羧甲基壳聚糖参考红外图谱

红外图谱解析如下：

- a) 1603 cm^{-1} 左右和 1418 cm^{-1} 左右的吸收峰分别为羧基的不对称和对称伸缩振动吸收峰,表明羧基的存在;
- b) 1061 cm^{-1} 左右的吸收峰为伯醇所生成的醚键(C—O)的伸缩振动吸收峰,表明羧甲基化反应主要发生在C6位置;
- c) 2918 cm^{-1} 左右和 1327 cm^{-1} 左右的吸收峰分别为 C—H 键的伸缩振动和弯曲振动吸收峰;
- d) 3408 cm^{-1} 左右的强宽吸收峰为 O—H 和 N—H 的伸缩振动吸收峰。

附 录 B

(规范性附录)

羧甲基壳聚糖脱乙酰度和取代度测定

B.1 原理

取代度为试样中羧甲基的总摩尔数占试样中总的氨基糖单元摩尔数的百分数,脱乙酰度为试样中脱乙酰基的氨基糖单元摩尔数占试样中总的氨基糖单元摩尔数的百分数。

将试样溶于盐酸溶液,用氢氧化钠标准溶液将已知量的酸式羧甲基壳聚糖重新滴定成钠盐,滴定曲线中先后出现第一拐点(过剩盐酸滴定终点),第二拐点(羧基滴定终点),第三拐点(氨基滴定终点),可测得试样中羧基和氨基的含量,从而计算出羧甲基壳聚糖的取代度和脱乙酰度。

B.2 设备与试剂

分析天平,滴定仪(或碱式滴定管、酸度计和恒温磁力搅拌器),盐酸(分析纯及以上)和氢氧化钠滴定液。

B.3 实验步骤

取 0.1 g 羧甲基壳聚糖,精密称定,加入 20 mL 0.3 mol/L 盐酸溶液溶解,用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液滴定,记录滴定液消耗的体积与 pH 值。以滴定液消耗的体积为横坐标,溶液的 pH 值为纵坐标作图,得到所测样品的 pH 滴定曲线,或者以滴定液消耗的体积为横坐标, $\Delta\text{pH}/\Delta V_{\text{NaOH}}$ 为纵坐标作图,得到一阶微商曲线。

注 1: 可根据具体情况调整样品的取样量、盐酸溶液浓度和体积。

注 2: 如果在曲线上无法确定突跃点,可通过观察原始滴定数据的变化值并结合 pH 值范围来确定。

B.4 计算

羧甲基壳聚糖取代度和脱乙酰度分别按式(B.1)和式(B.2)计算。

$$w_{\text{DS}} = \frac{203 \times \Delta V_1 \times c_1}{m \times (1 - w_0) - 80 \times \Delta V_1 \times c_1 + 42 \times \Delta V_2 \times c_1} \times 100\% \quad \text{.....(B.1)}$$

$$w_{\text{DD}} = \frac{203 \times \Delta V_2 \times c_1}{m \times (1 - w_0) - 80 \times \Delta V_1 \times c_1 + 42 \times \Delta V_2 \times c_1} \times 100\% \quad \text{.....(B.2)}$$

式中:

w_{DS} ——样品取代度,%;

w_{DD} ——样品脱乙酰度,%;

203——N-乙酰氨基-D-葡萄糖结构单元相对分子量;

ΔV_1 ——第一和第二突跃点之间消耗的 NaOH 滴定液的体积之差,单位为毫升(mL);

ΔV_2 ——第三和第二突跃点之间消耗的 NaOH 滴定液的体积之差,单位为毫升(mL);

c_1 ——NaOH 滴定液的浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

- m ——样品质量,单位为毫克(mg);
- w_0 ——样品的干燥失重,%;
- 80 ——羧甲基钠的相对分子质量;
- 42 ——乙酰基的相对分子质量。

附 录 C
(规范性附录)
等电点的测定

C.1 原理

在波长 250 nm 处羧甲基壳聚糖有明显的紫外吸收,用盐酸溶液调节羧甲基壳聚糖水溶液的 pH 值,由于羧甲基壳聚糖具有两性物质特性,羧甲基壳聚糖会随着 pH 值下降产生白色絮状沉淀,当羧甲基壳聚糖中氨基和羧基均以带电荷形式存在,处于电中性状态,沉淀达到最大,此时的 pH 值为羧甲基壳聚糖的等电点,随着 pH 值继续下降,溶液逐渐变澄清,沉淀溶解。

C.2 设备

紫外-可见分光光度计、pH 计、恒温磁力搅拌器。

C.3 样品准备

供试液制备:称取一定量的羧甲基壳聚糖用纯化水配制成质量浓度为 0.3% 左右的溶液 500 mL,搅拌使完全溶解,过滤掉不溶物。

供试液 pH 梯度调节:将供试液分装在 12 个 100 mL 烧杯中,每杯 30 mL,用恒温磁力搅拌器不断搅拌,用 pH 计连续测定溶液 pH 值,缓慢向其中滴加 0.05 mol/L 盐酸溶液,调节每杯 pH 分别为 5.2, 5.0, 4.8, 4.6, 4.4, 4.2, 4.0, 3.8, 3.6, 3.4, 3.2, 3.0 后,离心或用滤纸过滤掉不溶物,以纯化水为空白对照,测定滤液在 250 nm 处的透光率。

注:可根据样品的等电点标示值调整供试液的 pH 值范围。

C.4 结果处理

以透光率 T 为纵坐标, pH 为横坐标作 T -pH 曲线,观察透光率发生突变的点,羧甲基壳聚糖的等电点为透光率突跃为最大值的 pH 值。

附 录 D

(规范性附录)

重均分子质量及分子质量分布系数测定

D.1 原理

光散射法是测定高聚物绝对分子质量的方法。高分子溶液可视为不均匀介质,当光通过它时,入射光就会发生散射。其散射光强度远高于纯溶剂,并且与高聚物的相对分子质量链形态、溶液浓度、散射光角度和折光指数增量(dn/dc)密切相关。因此由光散射法测得不同浓度的高聚物溶液在不同散射角(θ)下的散射光强(I_θ)数据后,即可求得其重均分子质量(M_w)等。若要得到分子质量分布系数,可采用激光散射-凝胶渗透色谱联用法(MALS-GPC)。

D.2 设备

分析天平、激光散射仪、示差检测器、高效液相色谱泵、柱温箱、保护柱、适宜的色谱柱;进样环。

D.3 溶液制备

D.3.1 流动相

0.1 mol/L 硝酸钠-0.02%叠氮化钠溶液:精密配制 0.1 mol/L 硝酸钠-0.02%叠氮化钠溶液,并用 0.45 μm 的滤膜过滤。

D.3.2 样品溶液制备

准确称取样品,用流动相溶解并稀释至含羧甲基壳聚糖 0.02 mg/mL~0.05 mg/mL(或根据样品分子量大小稀释至适当浓度,使样品溶液能够通过色谱柱,并且不影响响应值),并用 0.45 μm 的滤膜过滤。

注:试验所用试剂均为分析纯及以上。

D.4 步骤

折光指数增量(dn/dc):由各企业或实验室自行测定。

将色谱柱与激光散射仪和示差检测器连接,流动相冲洗至基线平稳后,取适量样品溶液进样,在规定流速、色谱柱温度条件下检测样品的分子质量及分子质量分布。

D.5 结果计算

检测完毕后,通过仪器配套的色谱分析软件确定样品的峰面积,输入 dn/dc 值,根据软件要求设置其他相关参数,计算分子质量及分子质量分布系数并输出报告。

注 1:同一物质在同一溶剂下的折光指数增量为一恒值。

注 2:也可采用经过验证的凝胶色谱法。

附 录 E
(规范性附录)
羧甲基壳聚糖含量测定

E.1 测定

按《中华人民共和国药典(2015 年版 四部)》0704 氮测定法测定。

E.2 结果计算

羧甲基壳聚糖含量按照式(E.1)和式(E.2)计算：

$$w_N = \frac{(V_1 - V_0) \times c_2 \times 2 \times 14}{m \times (1 - w_F)} \dots\dots\dots (E.1)$$

$$w_1 = \frac{w_N \times \bar{M}}{14 \times 1\,000} \times 100\% \dots\dots\dots (E.2)$$

式中：

w_N ——待检样品中的总氮含量,单位为毫克每克(mg/g)；

m ——待检样品质量,单位为克(g)；

w_F ——待检样品中水分含量,％；

V_1 ——样品管消耗硫酸滴定液体积,单位为毫升(mL)；

V_0 ——空白管消耗硫酸滴定液体积,单位为毫升(mL)；

c_2 ——硫酸滴定液的浓度,单位为摩尔每升(mol/L)；

w_1 ——羧甲基壳聚糖含量,％；

14 ——氮原子质量；

$\bar{M}$ ——理论条件下,羧甲基壳聚糖糖单元平均相对分子质量。

糖单元平均相对分子质量计算式：

$$\bar{M} = (80 \times w_{DS} + 161) + (1 - w_{DD}) \times 42 \dots\dots\dots (E.3)$$

式中：

w_{DS} ——样品取代度,％；

w_{DD} ——样品脱乙酰度,％。

附录 F
(规范性附录)
蛋白质含量测定

F.1 原理

库马斯亮蓝 G-250(Coomassie Brilliant Blue G-250)具有两种色调,在游离状态下呈红色,与蛋白质结合后转为青色,其颜色深浅与蛋白质的浓度成正比,且在 595 nm 处有最大光吸收,可用分光光度计进行测定。

F.2 设备

分析天平、紫外分光光度计、旋涡式混合器。

F.3 溶液制备

库马斯亮蓝 G-250 试液:称取库马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶解于 50 mL 的 95%乙醇中,溶解后再加入盐酸 50 mL,并用纯化水稀释至 1 000 mL,置于棕色瓶内,室温贮存。

蛋白质标准溶液:称取牛血清白蛋白适量于容量瓶中,用纯化水定容,配成 30 μg/mL 的蛋白质标准溶液,2℃~8℃储存。

注:试验所用试剂均为分析纯及以上。

F.4 样品准备

取羧甲基壳聚糖 100 mg 精密称量,置于容量瓶中,加纯化水使其完全溶解并充分振荡混匀后定容,计算样品溶液中羧甲基壳聚糖的浓度。

F.5 测定步骤

按表 F.1 配制蛋白质标准溶液。

表 F.1 蛋白质标准溶液配制

试管号	0	1	2	3	4	5
蛋白质标准溶液体积/mL	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.0
水体积/mL	1.0	0.9	0.8	0.6	0.2	0
蛋白质质量浓度/(μg/mL)	0	3	6	12	24	30

取样品溶液 1 mL 于样品管中,在标准液系列的各管及样品管中分别加入 5 mL 的库马斯亮蓝 G-250 试液。用旋涡式混合器使试管中溶液充分混合,并在室温(20±10)℃下放置 15 min。用 0 号管做对照,用分光光度计测定 595 nm 处各标准管和样品管的吸光度。用标准管绘制吸光度-浓度曲线,根

据样品管的吸光度从标准曲线上查得样品溶液的蛋白质质量浓度。

F.6 结果计算

按式(F.1)计算羧甲基壳聚糖中蛋白质含量 w_2 ：

$$w_2 = \frac{\rho_2}{\rho_1} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (F.1)$$

式中：

w_2 —— 羧甲基壳聚糖中蛋白质含量，%；

ρ_1 —— 样品溶液中羧甲基壳聚糖质量浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

ρ_2 —— 样品溶液中蛋白质质量浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

附 录 G
(规范性附录)
乙醇残留量测定(气相色谱法)

G.1 原理

采用顶空气相色谱法使要测定的乙醇与其他组分分开,用氢火焰离子化检测器检测,用外标法计算试验结果。

G.2 设备与试剂

G.2.1 气相色谱仪:配备氢火焰离子化检测器、顶空进样器。

G.2.2 色谱柱:6%氰丙基苯基-甲基聚硅氧烷(30 m×0.32 mm,1.8 μm)或相同分离效果的其他色谱柱。

G.2.3 无水乙醇:分析纯及以上。

G.3 乙醇标准溶液制备

取无水乙醇适量置于容量瓶中,精密称定,用纯化水稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL含1 mg的标准贮备溶液。在2℃~8℃储存,有效期为1个月。临用前,取标准贮备溶液稀释成10 μg/mL~250 μg/mL的系列标准溶液。

G.4 操作条件

柱温:50℃,保持2 min,以10℃/min的速率升至160℃,保持5 min。汽化、检测器温度:250℃。

G.5 步骤

取羧甲基壳聚糖0.05 g~0.10 g,精密称定,置顶空瓶中,准确加入纯化水2.0 mL,混合均匀。精密量取乙醇标准溶液各2.0 mL,置顶空瓶中,压盖密封。将样品瓶和标准系列置于80℃加热30 min,在规定的色谱分析条件下,顶空进样,待乙醇色谱峰流出后,量取乙醇峰的面积值,作为外标的定量标准。用标准系列绘制峰面积-乙醇浓度曲线,并根据样品溶液的峰面积查出对应的乙醇浓度。

G.6 结果计算

羧甲基壳聚糖中乙醇的残留量 w_3 可按式(G.1)计算:

$$w_3 = \frac{\rho_3 \times 10^{-6} \times V}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (G.1)$$

式中:

w_3 ——样品中乙醇的残留量,%;

ρ_3 ——标准曲线上查得的样品溶液的乙醇质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

m ——样品的称样量,单位为克(g);

V ——样品溶液的体积,2.0 mL。

附 录 H

(规范性附录)

二甘醇酸残留量测定

H.1 第一法:离子色谱法

H.1.1 原理

采用离子色谱法使要测定的二甘醇酸与其他组分分开,用电导检测器检测,并将得到的样品的二甘醇酸色谱峰与外标物得到的色谱峰相比较。

H.1.2 设备与试剂

H.1.2.1 离子色谱仪:配有电导检测器、自动进样器。

H.1.2.2 色谱柱:Lon Pac ICE AS9-HC¹⁾或相同分离效果的其他色谱柱。

H.1.2.3 注射器、0.22 μm 的无机滤膜。

H.1.2.4 二甘醇酸:分析纯及以上。

H.1.3 二甘醇酸标准溶液制备

取二甘醇酸适量置于容量瓶中,精密称定,用去离子水稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.1 mg 的标准贮备溶液。在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 储存,有效期为 1 个月。临用前,取标准贮备溶液稀释成 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液。

H.1.4 操作条件

淋洗液:12 mmol/L Na_2CO_3 (去离子水溶液);流速:1.0 mL/min。

H.1.5 步骤

取羧甲基壳聚糖约 0.3 g,精密称定,置容量瓶中,准确加入去离子水,溶解定容成约含羧甲基壳聚糖 3 mg/mL 的样品溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后,取过滤液为供试品溶液,精密量取供试品溶液和二甘醇酸标准溶液系列适量,进样,待二甘醇酸色谱峰流出后,取二甘醇酸峰的面积值,作为外标的定量标准。用标准系列绘制峰面积-二甘醇酸浓度曲线,并根据供试品溶液的峰面积查出对应的二甘醇酸浓度。

H.1.6 结果计算

样品中二甘醇酸的浓度 w_4 可按式(H.1)计算:

$$w_4 = \frac{\rho_4 \times 10^{-6} \times V_3}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (\text{H.1})$$

式中:

w_4 ——样品中二甘醇酸的残留量,%;

ρ_4 ——标准曲线上查得的样品溶液中二甘醇酸的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——样品的称样量,单位为克(g);

1) Lon Pac ICE AS9-HC 是适合的色谱柱的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对这一产品的认可。

V_3 ——样品稀释后体积,单位为毫升(mL)。

注 1: 对不同离子色谱体系,洗脱程序可能存在差异,可以采用其他符合系统适用性要求的洗脱体系。

注 2: 本法为仲裁法。

H.2 第二法:高效液相色谱法

H.2.1 原理

采用高效液相色谱法使要测定的二甘醇酸与其他组分分开,用紫外检测器检测,并将得到的二甘醇酸谱峰与外标物得到的色谱峰相比较。

H.2.2 设备与试剂

H.2.2.1 高效液相色谱仪,紫外检测器。

H.2.2.2 色谱柱:symmetry C18 色谱柱²⁾或类似分离效果的其他色谱柱。

H.2.2.3 二甘醇酸:分析纯及以上。

H.2.3 二甘醇酸标准溶液制备

取二甘醇酸适量置于容量瓶中,精密称定,用去离子水稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.1 mg 的标准贮备溶液。在 2 °C~8 °C 储存,有效期为 1 个月。临用前,取标准贮备溶液稀释成 2 µg/mL~30 µg/mL 的系列标准溶液。

H.2.4 操作条件

H.2.4.1 流动相:0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液:甲醇=97:3。

H.2.4.2 流速:1.0 mL/min。

注:流动相用磷酸调节 pH 至 2.0。

H.2.5 步骤

取供试品 0.250 g,精密称定,准确加入浸提液(甲醇:水=7:4)10 mL,超声提取 10 min 后,6 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用流动相稀释适当倍数,经 0.22 µm 滤膜过滤后,作为供试品进样溶液。取 20 µL,在规定的色谱分析条件下进样,记录色谱图。精密量取二甘醇酸标准溶液 20 µL,在规定的色谱分析条件下进样,记录色谱图。用标准系列绘制峰面积-二甘醇酸浓度曲线,并根据样品溶液的峰面积查出对应的二甘醇酸浓度。

H.2.6 结果计算

样品中二甘醇酸的残留量 w_5 可按式(H.2)计算:

$$w_5 = \frac{\rho_5 \times 10^{-6} \times V_3}{m} \times 100\% \dots\dots\dots (H.2)$$

式中:

w_5 ——样品中二甘醇酸的残留量,%;

ρ_5 ——标准曲线上查得的样品溶液中二甘醇酸的质量浓度,单位为微克每毫升(µg/mL);

m ——样品的称样量,单位为克(g);

V_3 ——样品稀释后体积,单位为毫升(mL)。

2) symmetry C18 是适合的色谱柱的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对这一产品的认可。

附 录 I
(资料性附录)
羧甲基壳聚糖降解试验

I.1 概述

本附录提供了羧甲基壳聚糖材料体内降解试验的一种方法,通过将羧甲基壳聚糖材料置于两底面为透析膜的圆柱体容器中,然后植入新西兰试验用兔体内,分不同时间点取出材料,进行降解率、分子质量及分子质量分布测定。

I.2 材料准备

I.2.1 实验动物:健康成年新西兰试验用兔,体重 2.5 kg~3.2 kg,皮肤无损伤。

I.2.2 手术剪、手术刀片、止血钳、持针钳、套针、缝合针、缝合线、棉球、纱布、手术洞巾,试验前应用高压蒸气灭菌。准备足量的麻醉药。

I.2.3 样品:羧甲基壳聚糖粉末。

I.2.4 容器:圆柱体容器[例如聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)材质的圆柱体容器],底面直径 1.5 cm,高度 2.5 cm。两底面为截留相对分子质量 1 000 的透析膜。

注:动物数量和总样本数参考 GB/T 16886.6。

I.3 试验步骤

每只试验用兔作为一个取样时间点,植入 4 支分别用样品容器承载的样品和 1 支直接植入的样品。

试验当天,剪去动物脊椎两侧区域毛,试验时静脉注射麻醉药,麻醉药的剂量按使用说明给药。按外科常规手术要求以碘酊和 75%(体积分数)乙醇消毒手术区域皮肤。

用钝器解剖法在一个皮肤切口部位制成一个或几个皮下囊,囊的底部距皮肤切口应为 10 mm 以上,每个囊内植入一个植入物,用套针将植入物推入囊内,植入物之间不能互相接触。

在规定取样时间点将样品取出,用纯化水冲去样品上的残余组织并用滤纸沾干,将样品置于干燥器中小于 500 Pa 真空干燥至恒重,根据重量变化计算不同时间点的降解率,并进行分子质量及分子质量分布测定。分子质量及分子质量分布测定操作按附录 D 方法进行。

注:每次试验前根据所植入的羧甲基壳聚糖设计取样时间点,取样时间点不少于 5 个,最后一个取样时间点载体降解率宜在 50%以上。

I.4 结果表示

报告不同时间点降解率、分子质量及分子质量分布。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.6 医疗器械生物学评价 第6部分:植入后局部反应试验
-

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
医用羧甲基壳聚糖
YY/T 0953—2020

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

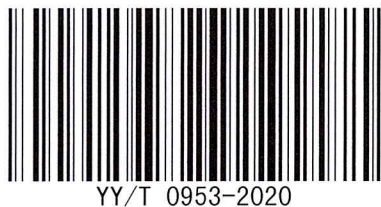
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 42 千字
2020 年 11 月第一版 2020 年 11 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-35118 定价 29.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



YY/T 0953-2020